临床研究

肝细胞癌多基因甲基化研究

程 越[1],张长松[2],郭献灵[2],卫立辛[2]
[1]河源市人民医院,广东 河源 517000;[2]第二军医大学东方肝胆外科医院,上海 200433

摘要:目的 通过研究肝癌中多基因启动子区的甲基化,说明抑癌基因甲基化在肝癌发生的普遍性。**方法** 分别抽提冻存的肝癌、癌旁组织和正常肝组织的DNA,利用亚硫酸氢钠具有使未甲基化的胞嘧啶转为尿嘧啶而不改变甲基化胞嘧啶的特性分别设计甲基化引物和非甲基化引物,然后分别进行PCR反应。我们分别检测了转移抑制基因*p15, SYK, TIMP-3, E-cadherin, RASSAF1*和肿瘤相关基因*p53, RB1, WT1, p14, p16*启动子区在60个肝癌、癌旁和6个正常肝组织的甲基化情况。**结果** 60个肝癌标本中10个基因的甲基化情况各不相同:从*p53*的8%~90%的RASSAF1;肝癌组织比癌旁组织的甲基化平均水平高,二者在统计学上有显著差异(P<0.05)。**结论** 肝癌中有多个基因存在甲基化,且肝癌组织甲基化水平较癌旁组织高。
关键词:肝细胞癌;基因;甲基化

Multi gene promotion in hepatocellular carcinoma

CHEN Yue[1], ZHANG Changsong[2], GUO Xianling[2], WEI Lixin[2]
[1]People's hospital of Heyuan, Heyuan 517000, China; [2]The East liver surgery hospital of Second military medical university, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To explain the aberrant methylation of tumor suppressor genes is common hepatocellular carcinoma. **Methods** Extracting cryopreservation of hepatocellular carcinoma, paracancerous tissues and normal liver tissues of DNA, using sodium bisulfite has the characteristics of unmethylated cytosine to uracil without changing the methylated cytosine methylation primers were designed and the non methylated primers, and then respectively by PCR reaction. We examined the metastasis suppressor gene p15, SYK, TIMP-3, E-cadherin, RASSAF1 and tumor related genes p53, RB1, WT1, P14, p16 promoter methylation status of the promoter region in 60 liver cancer, para cancer and 6 normal liver tissues. **Results** The frequency of promoter methylation of ten genes in 60 HCC varied from 8% in P53 to 90% in p14. The average methylated-gene numbers were significantly different between HCC and paired non-tumor tissues (P<0.05). **Conclusion** There are multiple gene methylation in HCC exist, and the level of methylation of liver cancer tissue than in noncancerous tissue high.
Key words: hepatocellular carcinoma; gene; methylation

肝细胞癌(HCC, 简称肝癌)是全球常见的恶性肿瘤之一,位居全球恶性肿瘤死因的第3位,且在世界范围内呈逐年上升之势[1]。肝细胞癌的病因和发病机制目前尚不十分清楚。HCC的病因复杂,可能和病毒性肝炎(HBV、HCV)、肝硬化、黄曲霉毒素、酒精和饮用水污染等有关。目前认为,HCC同其它恶性肿瘤一样,它的形成是个多因素、多阶段的过程。肝细胞癌的形成也是由于正常肝细胞在多种致癌因素影响下,因遗传(基因突变、杂合性缺失LOH、基因多态性等)和表观遗传学改变(DNA甲基化和染色质组蛋白的修饰等)的累积效应而导致的,包括染色体不稳定性、癌基因表达激活、抑癌基因沉默及DNA修复系统失活等[2-3]。表观遗传指在不影响DNA序列的情况下改变基因的表达,又称为"表观遗传修饰"。表观遗传修饰主要从以下3个层面参与基因的表达调控。(1)DNA修饰:DNA共价结合1个修饰基团,使具有相同序列的等位基因处于不同的修饰状态;(2)蛋白修饰:通过对特殊蛋白修饰或改变蛋白的构象实现对基因表达的调控;(3)非编码RNA的调控:RNA可通过某些机制实现对基因转录的调控以及对基因转录后的调控,如RNA干扰(RNAi)[4-5]。在肿瘤细胞分化和增殖中,基因突变、DNA甲基化紊乱表达、LOH缺失是导致癌基因和抑癌基因调控紊乱的主要原因,而DNA甲基化作为非常重要的表观遗传机制,均参与上述调控过程,在肿瘤的形成中发挥潜在作用[6]。

DNA甲基化常见于细菌、植物和哺乳动物,原核生物可产生3种甲基化碱基:N-6甲基化腺嘌呤、N-4甲基化胞嘧啶、C-5甲基化胞嘧啶;但在高等真核生物中仅发现C-5甲基化胞嘧啶。在哺乳动物基因组中,DNA甲基化是指胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)二核苷酸中的胞嘧啶第5位碳原子被甲基化。此过程是在DNA甲基转移酶(Dnmts)的催化下[7],以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到CpG二核苷酸中的胞嘧啶第5位碳原子上。哺乳动物基因组有5%~10%是CpG位点,其中70%~80%为甲基化CpG(methCpG)。

通常肿瘤细胞的DNA会发生整体低甲基化和一些基因的启动子区的CpG岛高甲基化,尤其是一些抑癌

收稿日期:2015-09-26
作者简介:程 越,硕士,主治医师,E-mail: chengyuextp@126.com

基因。DNA甲基化在很多种肿瘤可以作为恶性度、活性和预后判断的非常有用的指标[8-9]。抑癌基因启动子区CpG岛的高甲基化现象，这些基因包括有细胞周期调控基因比如p15、p16、p14；DNA修复基因hMLH1；细胞黏附基因E-cadherin，TIMP-3；解毒基因GSTP1；激素受体ER等[10]。高甲基化常常会抑制这些基因的表达，会引起细胞周期紊乱，使细胞恶性增殖；增强细胞的侵袭力和恶性度，使肿瘤细胞易于转移，在肿瘤发生发展的起始阶段发挥很重要的作用。

1 对象和方法

1.1 研究对象

本课题的研究对象为从2005年1~6月手术的肝癌病人，包括有49个男性和11个女性，年龄33~74岁，平均年龄为54.4岁，所有病人都通过H&E及免疫组化确诊。48例已经发生肝硬化，56例病人是乙型肝炎或者丙型肝炎抗原阳性的。

1.2 方法

1.2.1 组织中DNA提取　从液氮中取出黄豆大小的组织碾碎，采用经典的酚氯仿异戊醇法提取组织中全基因组DNA，提取后的基因组DNA用微量核酸定量仪测定其浓度和纯度后−40 ℃保存备用。

1.2.2 引物设计　根据表1设计并合成p14、p15、p16、RB甲基化和非甲基化引物各1对，所有引物由上海捷瑞工程有限公司合成，表1。

1.2.3 甲基化修饰　采用改进的Herman法对DNA进行

表1　基因甲基化和未甲基化引物

基因			引物序列 (5'-3')	产物 (bp)	参考文献
	U	F*	ATTTTGTGGGTTTTGTTTGGTG	140	
SYK		R	ACTTCCTTAACACACCCAAAC		
	M	F	CGATTTCGCGGGTTTCGTTC	243	
		R	AAAACGAACGCAACGCGAAAC		
	U	F	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	154	
P15		R	CCATACAATAACCAAACAACCAA		
	M	F	GCGTTCGTATTTTGCGGTT	148	
		R	CGTACAATAACCGAACGACCGA		
	U	F	TGGTTGTAGTTATGTATTTATTTTTAGTGGTGTT	120	
E-cadherin		R	ACACCAAATACAATCAAATCAAACCAAA		
	M	F	TGTAGTTACGTATTTATTTTTAGTGGCGTC	112	
		R	CGAATACGATCGAATCGAACCG		
	U	F	TTTTGTTTTGTTATTTTTTGTTTTTGGTTTT	122	
TIMP-3		R	CCCCCAAAAACCCCACCTCA		[5]
	M	F	CGTTTCGTTATTTTTTGTTTTCGGTTTC	116	
		R	CCGAAAACCCCGCCTCG		
	U	F	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	105	
RASSF1A		R	CAAACCCCACAAACTAAAAACAA		[5]
	M	F	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	93	
		R	AACCCCGCGAACTAAAAACGA		
	U	F	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	151	
P16		R	CAACCCCAAACCACAACCATAA		[5]
	M	F	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	150	
		R	GACCCCGAACCGCGACCGTAA		
	U	F	TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT	247	
P53		R	CCAATCCAAAAAAACATATCAC		[5]
	M	F	TTCGGTAGGCGGATTATTTG	193	
		R	AAATATCCCCGAAACCCAAC		
	U	F	TGGGATTTGGGTGGTATTTG	124	
WT1		R	CACCAACACCCACTACACCA		[5]
	M	F	GTTAGGCGTCGTCGAGGTTA	110	
		R	AAAACGCAAAATCCAACACC		
	U	F	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT	132	
P14		R	CACAAAAACCCTCACTCACAACAA		[5]
	M	F	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	122	
		R	AAAACCCTCACTCGCGACGA		
	U	F	GGGAGTTTTGTGGATGTGAT	172	
RB1		R	ACATCAAAACACACCCCA		[5]
	M	F	GGGAGTTTCGCGGACGTGAC	172	
		R	ACGTCGAAACACGCCCCG		

M, 甲基化; U, 未甲基化.

甲基化修饰。修饰后的DNA室温干燥，并加入双蒸水溶解。-60 ℃保存或直接进行扩增。MSP扩增条件如下：95 ℃ 6 min 1个循环，95 ℃ 30 s，55 ℃ 60 s，72 ℃ 60 s 40个循环，最后72 ℃ 6 min 1个循环。

1.2.4 结果判断 PCR产物用2.0%琼脂糖电泳溴化乙锭染色检测，用DNA Marker作为标准，在相应位置出现目的条带为阳性扩增。

1.3 统计分析

采用SPSS 19.0对数据进行统计分析。均以α=0.05作为检验水准，采用双侧检验，P<0.05为有统计学意义。

2 结果

采用MSP法分别检测5个肿瘤转移抑制基因和5个肿瘤相关基因转移抑制基因*p15*，*SYK*，*TIMP-3*，*E-cadherin*，*RASSAF1* 和肿瘤相关基因*p53*，*RB1*，*WT1*，*p14*，*p16*启动子区在60个肝癌、癌旁和6个正常肝组织的甲基化情况。10种基因在60例肝癌组织，60例癌旁组织和6例正常肝组织中MSP代表性的结果见图1。

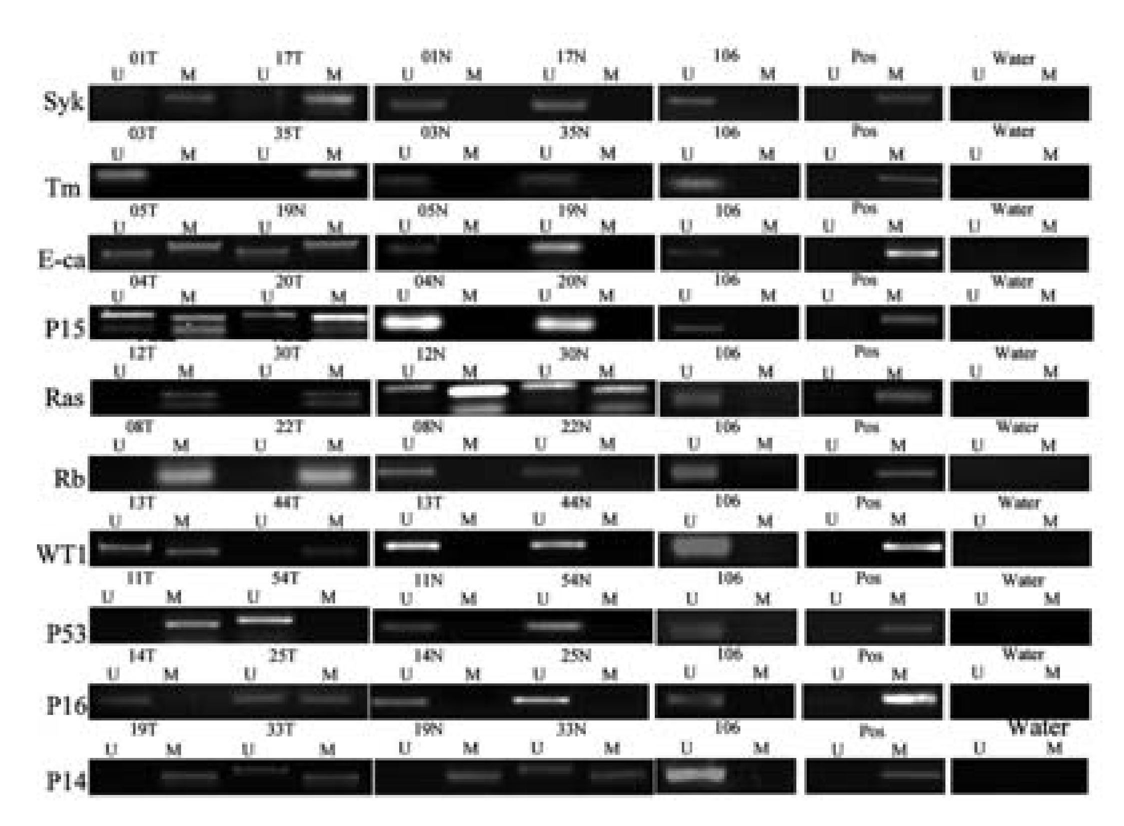


图1 10种基因MSP代表性的结果

研究发现这些基因启动子区在肝癌中甲基化情况各相同分别是 *SYK* 43%，*TIMP-3* 43%，*E-cadherin* 45%，*p15* 38%，*RASSAF1* 88%，*p53* 8%，*RB1* 25%，*WT1* 48%，*p14* 90%，*p16* 50%。

我们发现癌组织的平均甲基化水平明显高于癌旁组织，二者有统计学差异（P<0.05，图2）。我们认为在肝癌组织中基因的高甲基化情况存在，而且较周围癌旁组织的甲基化的数目多，因此我们推测多基因甲基化在肝硬化向肝癌的发生发展过程中发挥非常重要的作用。

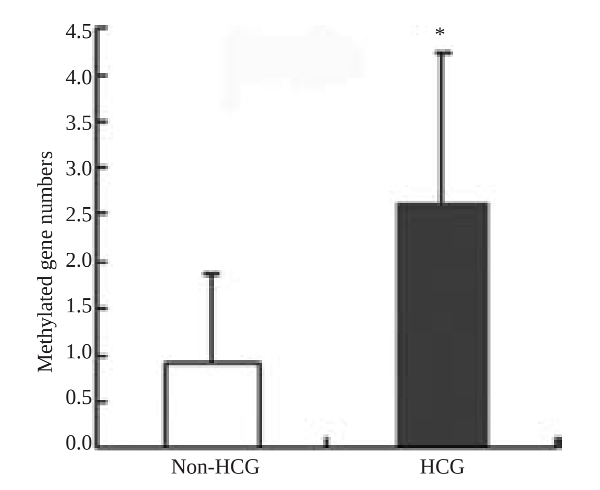


图2 甲基化在肝癌和癌旁组织的差异

Non-HCG与HCG比较. *P<0.05.

3 讨论

在肝癌发生过程中存在着多种抑癌基因启动子区

CpG岛的高甲基化现象，这些基因包括有细胞周期调控基因比如*p15*、*p16*、*p14*；DNA修复基因*hMLH1*；细胞黏附基因*E-cadherin*，*TIMP-3*；解毒基因*GSTP1*；激素受体ER等。高甲基化会抑制这些基因的表达，会引起细胞周期紊乱，使细胞恶性增殖；增强细胞的侵袭力和恶性度，使肿瘤细胞易于转移，在肝癌发生发展的起始阶段发挥很重要的作用[11]。

我们检测了10个肿瘤相关基因的启动子区的甲基化情况，启动子区的甲基化频率从*p53*的8%到p14的90%，大量研究提示肝癌中启动子区甲基化是很常见的现象。肝癌中*p53*、*p15*、*p16*、*p14*、*RASSF1A*、*SYK*、*TIMP*-3、*E-cadherin*、*WT1*、*RB1*启动子区的同时甲基化可能作为恶性肿瘤侵袭和进展很重要的指标DNA甲基化通过其特有的作用因子使基因沉默是非常复杂的，在肝癌的发生发展中有着非常重要的，但目前关于DNA甲基化在肝癌中如何发生，发生在肝癌的哪个阶段，并不清楚。DNA甲基化是引起肝癌的原因，还是肝癌发生中伴随有基因甲基化的改变都需要的我们作深入的研究。

参考文献：

[1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma -An epidemiologic view [J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 35(5, 2): S72-8.
[2] 熊 兰, 曾 斌. DNA甲基化与肝癌关系研究进展[J]. 社区医学杂志, 2013, 11(19): 24-6.
[3] 胡静娴, 谢渭芬. DNA甲基化与肝癌的研究现状[J]. 国际消化病杂志, 2013, 33(1): 25-8.
[4] 孙其恺, 王 伟, 荚卫东. 表观遗传修饰与肝癌的关系[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(9): 717-20.
[5] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-28.
[6] Davis CD, Uthus EO. DNA methylation,Cancer susceptibility,and nutrient interactions[J]. Exp Biol Med, 2004, 229(2): 988-95.
[7] Caiafa P, Zampieri M. DNA methylation and chromatin structure: The puzzling CpG islands[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(2): 257-65.
[8] Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3): 210-9.

(上接11页)

[5] 杨 思, 史铁梅, 张 浩, 等. 经阴道三维能量多普勒超声评价卵巢储备功能[J]. 中国介入影像与治疗学, 2013, 8(8): 486-9.
[6] 饶玉梅. 置含铜宫内节育器妇女卵巢储备功能的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2003.
[7] 穆丹梅, 田鹏, 张宏宇, 等. FSH、E2与卵巢基质血流、AFC联合评价卵巢储备功能的研究[C]//中国超声医学工程学会成立30周年暨第十二届全国超声医学学术大会论文汇编, 2014: 8-9.
[8] La Marca A, Malmusi S, Giulini S, et al. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation[J]. Hum Reprod, 2004, 19(12): 2738-41.
[9] Jkh W, Wnl C, Pnt A. et al Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation[J]. J clin Endocrin Metab, 2006, 91(10): 4057-63.
[10] Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, et al. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women[J]. Hum Reprod, 2007, 22(7): 1837-40.
[11] 闫海军. FSH、LH、E2、P及INH A在月经周期及卵泡生长调节中的作用机制[D]. 北京: 首都医科大学, 2014.
[12] Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, et al. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial[J]. Hum Reprod, 2005, 20(3): 611-5.
[13] Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, et al. A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standard' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram[J]. Hum Reprod, 2003, 18(4): 781-7.
[14] 任 妞. 正常生育期女性血清抗苗勒管激素水平的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.